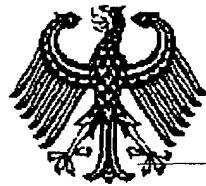


[Handwritten Signature]



REC'D 18 AUG 2000
WIPO PCT

DE00/01873

EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 26 068.0

Anmeldetag: 8. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Arne Skerra, Freising/DE

Bezeichnung: Muteine des Bilin-Bindungsproteins

IPC: C 07 K, C 12 N und C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Seller

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Seller

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden



Prof. Dr. Arne Skerra
Max-Lehner-Str. 18
85354 Freising

Tel.: 08161/71-4351
Fax: -4352

Mutante des Bilin-Bindungsproteins

=====

Zusammenfassung: "Muteine des Bilin-Bindungsproteins"

Die Erfindung bezieht sich auf Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag, (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist. Aufgrund ihres einfachen molekularen Aufbaus weisen die erfindungsgemäßen Muteine bei Herstellung und Verwendung Vorteile im Vergleich zu Antikörpern gegen die Digoxigeningruppe auf.

06.06.99
- 1 -

"Muteine des Bilin-Bindungsproteins"

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine des Bilin-Bindungs-
proteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusions-
proteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger
Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum
Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Bio-
10 molekülen.

Die Digoxigeningruppe ist ein heute in der Molekularbiologie
weit verbreitetes Instrument für den nichtradioaktiven Nach-
weis von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen. Zu
15 diesem Zweck wird das Biomolekül mit einem reaktiven Derivat
des Digoxigenins meist kovalent modifiziert, was den an-
schließenden Nachweis des Moleküls mit einem gegen die Digoxi-
geningruppe gerichteten Antikörper, bzw. einem Konjugat aus
20 einem entsprechenden Antikörperfragment und einem Reporter-
enzym, gemäß in der Biochemie allgemein üblichen Methoden ge-
stattet.

Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von reaktiven Digoxigenin-
derivaten bekannt, die teilweise auch kommerziell erhältlich
25 sind, Beispielsweise eignen sich Digoxigenin-3-O-methyl-
carbonyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester (DIG-
NHS), Digoxigenin-3-O-succinyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxy-
succinimidester und 3-Amino-3-desoxydigoxigenin-hemisuccin-
amid-succinimidylester zur kovalenten Kopplung mit Proteinen,
30 insbesondere mit den Aminogruppen von exponierten Lysinseiten-
ketten. Mit 3-Iodacetylamino-3-desoxydigoxigenin lassen sich
vorer allem Thiolgruppen in Proteinen oder anderen Biomolekülen
selektiv mit der Digoxigeningruppe markieren. Synthetische
35 Oligodesoxynukleotide können mit denselben reaktiven Digoxi-
geninderivaten gekoppelt werden, sofern sie im Verlauf der
Synthese mit geeigneten freien Amino- oder Thiolgruppen verse-
hen wurden.

Zur direkten Markierung von Nukleinsäuren eignen sich zudem cis-Platinkomplexe von Digoxigeninderivaten (DIG Chem-Link Reagent) oder Carbodiimidgruppen enthaltende Digoxigeninderivate (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 5 0 806 431 A2). Alternativ ist es im Fall von Desoxyribonukleinsäuren möglich, diese im Verlauf einer matrizenabhängigen enzymatischen Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase und eines mit der Digoxigeningruppe gekoppelten Desoxy-nukleosidtriphosphats, z. B. Digoxigenin-11-dUTP, Digoxigenin-10 11-ddUTP oder Digoxigenin-16-dATP, zu markieren. Analog eignet sich Digoxigenin-11-UTP zum Einbau in enzymatisch synthetisierte RNA. Darüber hinaus können Oligodesoxynukleotide direkt bei der automatisierten DNA-Synthese unter Einsatz geeigneter aktivierter Bausteine, z. B. sogenannter "Virtual Nucleotides", mit der Digoxigeningruppe markiert werden. Derartige mit der Digoxigeningruppe gekoppelte Nukleinsäuren eignen sich als nichtradioaktive Gensonden zum Nachweis komplementärer Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung, z. B. in Northern oder Southern Blots (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 324 474 A1).

Mit der Digoxigeningruppe markierte Proteine oder Glycoproteine sind insbesondere von Nutzen, um beispielsweise entsprechende Antigene bzw. dagegen gerichtete Antikörper in immunchemischen Testverfahren wie ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) zu bestimmen. Der eigentliche Nachweis des mit der Digoxigeningruppe konjugierten Biomoleküls erfolgt normalerweise mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, in der Regel in der Form eines Konjugats aus dem Fab-Fragment dieses Antikörpers mit einem geeigneten Enzym, wie z. B. der Alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-Peroxidase, als Markierung. Die enzymatische Aktivität dient anschließend zur Quantifizierung durch Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder chemolumineszenten Reaktion. Verschiedene Antikörper gegen die Digoxigeningruppe sind bekannt (Mudgett-Hunter et al., J. Immunol. 129 (1982), 1165-1172; Jeffrey et al., J. Mol. Biol. 248 (1995), 344-360). /

Die Verwendung von Antikörpern hat jedoch mehrere Nachteile. So ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Hybridiomzellkulturen aufwendig, und die Proteolyse zum Fab-Fragment sowie die Produktion von Konjugaten mit Reporterenzymen erfordert zusätzliche schwierige Verfahrensschritte. Aber selbst die gentechnische Gewinnung von Antikörpern ist nicht einfach, was hauptsächlich darin begründet ist, daß sich Antikörper wie auch deren antigenbindende Fragmente in strukturell komplizierter Weise aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen. Bei der gentechnischen Manipulation von Antikörpern müssen deshalb zwei Gene gleichzeitig gehandhabt werden. Außerdem ist die Ausbeute an korrekt gefalteten Antikörperfragmenten bei deren gentechnischer Produktion häufig gering. Wie dem Fachmann bekannt ist, gilt dies umso mehr, wenn rekombinante Fusionsproteine aus Fab-Fragmenten von Antikörpern und Enzymen hergestellt werden sollen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, alternative Polypeptid-Reagenzien zum Nachweis der Digoxigeningruppe zu entwickeln, welche sich auf einfache Weise produzieren lassen.

In einem evolutiven Forschungsansatz wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß sich Muteine des strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Bilin-Bindungsproteins (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem. 219 (1994), 855-863) eignen, um die Digoxigeningruppe durch Bindung mit hoher Affinität nachzuweisen, wobei die Erkennung des Digoxigenins erstaunlich selektiv gegenüber anderen Steroiden erfolgt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
- (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
- (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

Außerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 können die Muteine der vorliegenden Erfindung der Aminosäuresequenz des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* entsprechen. Andererseits kann die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide auch außerhalb der genannten Positionen Unterschiede zum Bilin-Bindungsprotein aufweisen. Derartige Varianten der Sequenz des Bilin-Bindungsproteins umfassen natürlich vorkommende sowie künstlich erzeugte Varianten, und unter den Abweichungen werden Substitutionen, Insertionen, Deletionen von Aminosäureresten sowie N- und/oder C-terminale Additionen verstanden.

z. B. können die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins Aminosäuresubstitutionen aufweisen, welche eine Oligomerisierung des Bilin-Bindungsproteins vermeiden, wie die Substitution Asn(1)->Asp, oder um eine proteolytische Spaltung innerhalb der Polypeptidkette zu unterdrücken, die bei der Produktion in *E. coli* auftreten kann, z. B. durch die Substitution Lys(87)->Ser. Weiterhin können in die für die Muteine des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure die Mutationen Asn(21)->Gln und Lys(135)->Met eingeführt werden, um beispielsweise die Klonierung eines Genabschnitts über zwei neue *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen an diesen Positionen zu erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen innerhalb oder außerhalb der genannten Positionen, um ganz allgemein bestimmte Eigenschaften des erfindungsgemäßen Muteins zu verbessern, z. B. seine Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden, kann durch übliche Verfahren, z. B. ELISA, Fluoreszenztitration, Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen oder Blotting-Verfahren, beispielsweise Western-Blotting, Southern-Blotting oder Northern-Blotting, bestimmt werden. Blotting-Methoden können verwendet werden, um Konjugate des Digoxigenins mit

Proteinen oder Nukleinsäuren auf eine Membran zu transferieren und diese anschließend mit einem der erfindungsgemäßen Muteine, einem Konjugat dieses Muteins oder einem Fusionsprotein dieses Muteins nachzuweisen.

5

Eine quantitative Kenngröße für die Bindungsaffinität liefern etablierte thermodynamische Parameter, wie etwa die Affinitätskonstante oder die Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Mutein und dem gebundenen Liganden, z. B. Digoxigenin.

10 Aber auch eine qualitative Bestimmung der Bindungsfähigkeit ist möglich, z. B. anhand der Intensität eines Bindungssignals aufgrund einer chromogenen Reaktion bzw. eines Farbniederschlags, welcher mit Hilfe einer der genannten Blotting-Methoden erhalten wird.

15

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine werden in einem zweistufigen evolutiven Prozeß erhalten. Die Zufallsmutagenese des Bilin-Bindungsproteins und wiederholte Selektion von Muteinen mit Affinität zur Digoxigeningruppe aus dieser Bibliothek, wo-

20 bei freies Digoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird, liefert Muteine des Bilin-Bindungsproteins, die die Digoxigeningruppe erkennen, wobei aber die Affinität noch vergleichsweise niedrig ist. Die erneute Mutagenese eines solchen Muteins an den Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37,

25 nun gefolgt von einer wiederholten Anreicherung durch Komplexbildung mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des gebildeten Komplexes im sauren Milieu, führt daraufhin zur Gewinnung von Muteinen mit wesentlich höherer Affinität zur Digoxigeningruppe.

30

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Affinitätskonstante zwischen solchen erfindungsgemäßen Polypeptiden und Digoxigenin mindestens 10^7 M^{-1} beträgt. Anders ausgedrückt heißt dies, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist. Einzelne Exemplare zeigen sogar Dissoziationskonstanten von 35 nM oder kleiner, wie in den Beispielen ausgeführt ist.

Neben dem Digoxigenin können von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins auch Derivate des Digoxigenins als Ligand gebunden werden, z. B. Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin. Weiterhin können Konjugate dieser chemischen Verbindungen, d. h. mit Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin kovalent oder über einen Metallkomplex verknüpfte Nukleinsäuren, Polypeptide, Kohlenhydrate, andere natürliche oder synthetische Biomoleküle, Makromoleküle oder niedermolekulare Verbindungen, von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins gebunden werden. Vorzugsweise werden zur Herstellung solcher Konjugate die dem Fachmann bekannten reaktiven Derivate von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin eingesetzt, wie sie beispielsweise weiter oben angegeben sind.

15

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine, welche durch den beschriebenen zweistufigen Prozeß gewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu Digoxigenin eine noch höhere Affinität zu Digitoxin oder Digitoxigenin, deren Steroidsystem sich bloß durch das Fehlen einer Hydroxygruppe von dem des Digoxigenins unterscheidet. Überraschenderweise zeigen diese Muteine eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Digoxigenin- bzw. Digitoxigeningruppe, was sich darin ausdrückt, daß andere Steroide oder Steroidgruppen wie Ouabain oder Testosteron mit sehr viel geringerer Affinität, falls überhaupt, gebunden werden. Auch Derivate des Fluoresceins, wie 4-Aminofluorescein, werden offensichtlich nicht gebunden. Damit ist gemeint, daß Ouabain, Testosteron oder 4-Aminofluorescein jeweils eine Dissoziationskonstante von mindestens $10 \mu\text{M}$, bevorzugt mindestens $100 \mu\text{M}$, gegenüber den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins aufweisen.

In dieser Spezifitätseigenschaft unterscheiden sich diese Muteine erheblich von anderen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins sowie von gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörpern, wie z. B. dem Antikörper 26-10 (Chen et al., Protein Eng. 12 (1999), 349-356)), welcher Ouabain mit beträchtlicher Affinität bindet, was den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins einen besonderen Vorteil verleiht. Es

ist überraschend, daß gerade die zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 zu den bevorzugten Muteinen des Bilin-Bindungsproteins führen. Bevorzugt sind daher solche Muteine, die mindestens eine oder alle 5 der Aminosäuresubstitutionen Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile und Glu(37)->Thr tragen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Muteine tragen mindestens 10 eine der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und 15 Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein. Bei der gewählten Schreibweise ist jeweils zunächst die Aminosäure in dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscode P09464) zusammen mit der Sequenzposition für das mature Polypeptid in Klammern angegeben, und die entsprechende 20 Aminosäure in einem erfindungsgemäßen Mutein ist nach dem Pfeil genannt. Nochmals besonders bevorzugte Muteine gemäß dieser Erfindung tragen alle der genannten Aminosäuresubstitutionen.

25 Es ist überraschend, daß die Position 93 des Bilin-Bindungsproteins in den erfindungsgemäßen Muteinen nicht verändert ist, obwohl auch diese Aminosäure von der Mutagenese zur Herstellung der Zufallsbibliothek betroffen war. Bevorzugte Muteine des Bilin-Bindungsproteins tragen daher an dieser Position 30 die Aminosäure Val.

Für bestimmte Nachweisverfahren ist es günstig, die Muteine des Bilin-Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung in markierter Form zu verwenden. Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest eine Markierung trägt. Geeignete Markierungsgruppen sind dem Fachmann bekannt und umfassen Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumines-

zenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold. Ganz allgemein ist die Markierung mit Substanzen bzw. Enzymen möglich, die in einer chemischen oder enzymatischen Reaktion einen bestimmbaren Stoff erzeugen. Dabei können alle für Antikörper bekannten Markierungen auch an die erfindungsgemäßen Muteine gekoppelt werden.

Eine für die praktische Anwendung besonders vorteilhafte Möglichkeit besteht darin, die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins in der Form von Fusionsproteinen zu verwenden. Techniken zur Herstellung solcher Fusionsproteine mittels gentechnischer Methoden sind dem Fachmann bekannt. Geeignete Fusionspartner für die erfindungsgemäßen Muteine wären Enzyme und andere Polypeptide, Proteine oder Proteindomänen. Derartige Fusionen wären geeignet, um dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins zusätzliche Eigenschaften zu vermitteln, wie z. B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu anderen Molekülen, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Liganden.

Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-Bindungsdomäne oder die Immunglobulin-Bindungsdomäne von Protein G oder Protein A, Antikörperfragmente, Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder andere Bindungsproteine und deren funktionelle Bestandteile sowie Affinitätspeptide, wie z. B. das Strep-Tag oder das Strep-Tag II (Schmidt et al., J. Mol. Biol. 255 (1996), 753-766). Auch Proteine mit besonderen chromogenen oder fluorogenen Eigenschaften, wie z. B. das grün fluoreszierende Protein, eignen sich als Fusionspartner. Weiterhin käme das Hüllprotein III eines filamentösen Bakteriophagen, wie M13, f1 oder fd, oder ein Fragment dieses Hüllproteins als Fusionspartner in Frage.

Unter dem Begriff Fusionsproteine sollen hier ganz allgemein auch solche erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins verstanden werden, die mit einer Signalsequenz ausgestattet sind. Signalsequenzen am N-Terminus des erfindungsgemäßen Polypeptids können dazu dienen, dieses bei der Biosynthese in ein bestimmtes Zellkompartiment, z. B. das Periplasma von *E. coli* oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle, bzw. in das die Zelle umgebende Medium zu dirigieren. Dabei wird die Signalsequenz normalerweise von einer Signalpeptidase abgespalten. Außerdem können andere Signal- bzw. Targeting-Sequenzen verwendet werden, die nicht unbedingt am N-Terminus des Polypeptids angebracht sein müssen, und die dessen Lokalisierung in speziellen Zellkompartimenten ermöglichen. Eine bevorzugte Signalsequenz zur Sekretion in das Periplasma von *E. coli* ist die OmpA-Signalsequenz. Weitere Signalsequenzen sowie Targeting-Sequenzen sind im Stand der Technik in großer Zahl bekannt.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins besteht darin, daß sich sowohl deren N-Terminus als auch deren C-Terminus zur Herstellung von Fusionsproteinen eignet. Im Gegensatz zu Antikörpern, bei denen sich der N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinkette in räumlicher Nähe zur Antigenbindungsstelle befinden, können bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden beide Enden der Polypeptidkette zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, ohne daß die Bindung des Liganden beeinträchtigt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminalen des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist. Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung sind Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins oder von Fusionsproteinen mit dem Aminoterminalen von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

Ein bevorzugtes Enzym zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine ist die bakterielle Alkalische Phosphatase (Sowadski et al., J. Mol. Biol. 186 (1985) 417-433). Diese kann einerseits am N-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins oder am C-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins angebracht sein. Zusätzlich kann ein solches Fusionsprotein eine Signalsequenz tragen, wie z. B. OmpA oder PhoA, die dessen Sekretion in das Periplasma von *E. coli* bewirkt, wo sich die Disulfidbindungen in der Polypeptidkette effizient ausbilden können. Weiterhin kann es mit einem Affinitätspeptid ausgestattet sein, wie z. B. dem Strep-Tag II, welches dessen einfache Reinigung erlaubt. Spezifische erfindungsgemäße Fusionsproteine sind in den Beispielen beschrieben. Ein Vorteil eines derartigen Fusionsproteins besteht darin, daß es direkt eine chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Nachweisreaktion katalysieren kann, was seinen Einsatz zur Detektion der Digoxigeningruppe vereinfacht.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung der Alkalischen Phosphatase zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine besteht darin, daß dieses Enzym zu einem stabilen Homodimer assoziiert und demzufolge dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins als Bestandteil des Fusionsproteins die Eigenschaft der Bivalenz verleiht. Auf diese Weise kann bei der Bindung der Digoxigengruppe ein Aviditätseffekt resultieren, der die Nachweisempfindlichkeit steigert. Ein solcher Aviditätseffekt ist insbesondere zu erwarten, wenn das mit Digoxigenin markierte Molekül an einer festen Phase adsorbiert ist, in oligomerer bzw. membrangebundener Form vorliegt oder mit mehreren Digoxigeningruppen konjugiert ist. Andere homodimere Enzyme eignen sich analog zur Herstellung bivalenter Fusionsproteine mit den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins.

Abgesehen von der bakteriellen Alkalischen Phosphatase können auch Phosphatasen aus eukaryontischen Organismen, wie z. B. die kalbsintestinale Phosphatase (CIP), zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwendet werden. Diese zeichnen sich oftmals durch höhere enzymatische Aktivität aus (Murphy)

und Kantrowitz, Mol. Microbiol. 12 (1994), 351-357), was eine größere Nachweisempfindlichkeit bewirken kann. Auch Mutanten der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit verbesserter katalytischer Aktivität (Mandecki et al., Protein Eng. 4 (1991), 5 801-804) lassen sich zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwenden. Weiterhin eignen sich andere dem Fachmann bekannte Enzyme, welche chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Reaktionen katalysieren, wie z. B. die β -Galactosidase oder die Meerrettich-Peroxidase, zur Herstellung er- 10 findungsgemäßer Fusionsproteine. All diese Enzyme können darüber hinaus ebenso zur Markierung von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins eingesetzt werden, indem sie z. B. unter Verwen- 15 dung üblicher Kopplungsreagenzien mit dem separat gewonnenen Mutein oder einem Fusionsprotein des Muteins konjugiert wer- den.

Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Nukleinsäure, die eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende 20 Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Vektors sein, auf dem eine operativ funktionelle Umgebung zur Expression der Nukleinsäure gegeben ist. Geeignete Vektoren sind in großer Zahl aus dem Stand der Technik bekannt und werden hierin nicht ausführlich beschrieben. Unter einer operativ 25 funktionellen Umgebung werden solche Elemente verstanden, die die Transkription und/oder nachfolgende Prozessierung einer mRNA ermöglichen, begünstigen, erleichtern und/oder erhöhen. Beispiele für derartige Elemente sind etwa Promotoren, Enhancer, Transkriptionsinitiationsstellen und -terminationsstel- 30 len, Translationsinitiationsstellen, Polyadenylierungssignale etc.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ihre Umgebung kann dabei dergestalt sein, daß die Biosynthese des Polypeptids im 35 Cytosol erfolgt, wobei der Polypeptidsequenz ggf. ein Start-Methionin vorangestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dagegen eine N-terminale Signalsequenz verwendet, insbesondere die OmpA- oder die PhoA-Signalsequenz, um das erfindungsgemäße Polypeptid in das Periplasma von *E. coli*

zu dirigieren, wo die Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten wird und sich die Polypeptidkette unter oxidativer Ausbildung der Disulfidbindungen falten kann. Eukaryontische Signalsequenzen können Verwendung finden, um das erfindungsgemäße Polypeptid in einem eukaryontischen Wirtsorganismus zu sekretieren. Grundsätzlich kommen zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure sowohl prokaryontische, bevorzugt *E. coli*, als auch eukaryontische Zellen wie z. B. Hefen in Betracht.

10

Unter einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Muteins oder Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die 15 für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturerstand gewonnen wird. In der Regel wird dazu zunächst eine 20 geeignete Wirtszelle mit einem Vektor, der eine für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Nukleinsäure umfaßt, transformiert. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Biosynthese des Polypeptids erfolgt, und das erfindungsgemäße Polypeptid wird gewonnen.

25

Bezüglich des Herstellungsverfahrens ist zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins zwei strukturelle Disulfidbindungen aufweisen, und daß in entsprechenden Fusionsproteinen ggf. zusätzliche Disulfidbindungen 30 vorliegen. Die mit der Proteininfaltung einhergehende Ausbildung dieser Disulfidbindungen ist in der Regel gewährleistet, wenn das erfindungsgemäße Polypeptid mit Hilfe einer geeigneten Signalsequenz in ein Zellkompartiment mit oxidierendem Thiol/Disulfid-Redoxmilieu dirigiert wird, beispielsweise das 35 bakterielle Periplasma oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle. Das erfindungsgemäße Polypeptid läßt sich dabei durch Zellfraktionierung freisetzen oder aus dem Kulturerstand gewinnen. Ggf. läßt sich die Fal tungseffizienz durch Überproduktion von Protein-Disulfidiso-

merasen, wie z. B. dem DsbC-Protein von *E. coli*, oder von Fal-tungs-Hilfsproteinen steigern.

Andererseits ist es möglich, ein erfindungsgemäßes Polypeptid
5 im Cytosol einer Wirtszelle, bevorzugt *E. coli*, zu produzie-
ren. Es kann dann z. B. in Form von Einschlußkörpern gewonnen
und anschließend *in vitro* renaturiert werden. Je nach Verwen-
dungszweck kann das Protein mittels verschiedener dem Fachmann
bekannter Methoden gereinigt werden. Zur Reinigung der erfin-
10 dungsgemäßigen Muteine des Bilin-Bindungsproteins eignet sich z.
B. die Affinitätschromatographie mit einem Säulenmaterial,
welches Digoxigeningruppen trägt. Zur Reinigung von Fusions-
proteinen der Muteine des Bilin-Bindungsproteins können die
aus dem Stand der Technik bekannten Affinitätseigenschaften
15 des Fusionsproteins ausgenutzt werden, z. B. die des Strep-
Tags oder des Strep-Tags II (Schmidt und Skerra, J.
Chromatogr. A 676 (1994), 337-345; Voss und Skerra, Protein
Eng. 10 (1997), 975-982), die der Albumin-Bindungsdomäne
(Nygren et al., J. Mol. Recogn. 1 (1988), 69-74) oder die der
20 Alkalischen Phosphatase (McCafferty et al., Protein Eng. 4
(1991) 955-961). Bei den Verfahren zur Herstellung der erfin-
dungsgemäßigen Polypeptide ist die Tatsache, daß die Muteine des
Bilin-Bindungsproteins nur aus einer einzelnen Polypeptidkette
bestehen, von Vorteil, da weder dafür zu sorgen ist, daß meh-
25 rere verschiedene Polypeptidketten gleichzeitig innerhalb
einer Zelle synthetisiert werden müssen, noch, daß unter-
schiedliche Polypeptidketten in funktioneller Weise miteinan-
der assoziieren.

30 Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten für die erfindungsge-
mäßigen Muteine des Bilin-Bindungsproteins entsprechen im we-
sentlichen denjenigen herkömmlicher Antikörper oder Antikör-
perfragmente mit Bindungsaaffinität zu Digoxigenin. Demnach be-
trifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsge-
35 mäßigen Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des
Bilin-Bindungsproteins in einem Verfahren zum Nachweis, zur
Bestimmung, zur Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digo-
xigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen,
Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder syn-

thetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins oder ihrer Fusionsproteine in Nachweisverfahren kann im wesentlichen analog zu den entsprechenden Nachweisverfahren erfolgen, die für Antikörper gegen Digoxigenin, sowie deren Fragmente und/oder Konjugate, bekannt sind. Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

Zu diesem Zweck kann das Mutein direkt, z. B. durch kovalente Kopplung, markiert sein. Aber auch indirekte Markierungen, z. B. mittels markierter Antikörper gegen das Bilin-Bindungsprotein oder dessen Muteine oder gegen Domänen von Fusionsproteinen dieser Muteine, können eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung erfindungsgemäßer Fusionsproteine mit einem Enzym, z. B. der Alkalischen Phosphatase, anstelle eines markierten Muteins des Bilin-Bindungsproteins. In diesem Fall lässt sich das Bestimmungsverfahren mit einer besonders geringen Zahl von Verfahrensschritten gestalten, wobei z. B. die Fähigkeit zur Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder lumineszenten Nachweisreaktion durch das Enzym als Bestandteil des Fusionsproteins unmittelbar ausgenutzt werden kann. Die leichte Verfügbarkeit solcher Fusionsproteine stellt hierbei einen besonderen Vorteil im Vergleich zu entsprechenden Fusionsproteinen herkömmlicher Antikörper dar. Die Ausnutzung des oben beschriebenen Aviditätseffekts im Fall eines oligomeren Fusionsproteins stellt einen weiteren Vorteil bei einem solchen Verfahren dar.

Ein Bestimmungsverfahren für die Digoxigeningruppe kann z. B. qualitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konju-

gierten Nukleinsäuren in Southern- bzw. Northern-Blots oder von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Proteinen in Western-Blots durchgeführt werden. Ein Bestimmungsverfahren kann auch quantitativ zum Nachweis von mit der Digoxigenin-

5 gruppe konjugierten Proteinen im ELISA durchgeführt werden. Zudem eignet sich ein erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren zum indirekten Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Proteinen oder anderen Molekülen unter Verwendung eines gegen das Protein oder Molekül gerichteten Bindungsproteins, z. B.

10 eines Antikörpers bzw. seines Fragments, welches mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist. Auch der indirekte Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Nukleinsäuren unter Verwendung eines mit dieser Nukleinsäure hybridisierenden Gensonde, welche mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist, ist möglich.

15 Eine Anwendung in der medizinischen Diagnostik oder Therapie ergibt sich zudem bei der Bestimmung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin, ohne daß diese Liganden mit einem anderen Molekül konjugiert sein müssen.

20 Die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine können auch zur Immobilisierung eines mit der Digoxigeningruppe konjugierten Moleküls verwendet werden. Diese Immobilisierung erfolgt vorzugsweise an mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen beschichteten Festphasen, wie etwa Mikrotiterplatten, Immunosticks, Mikrobeads aus organischen, anorganischen oder paramagnetischen Materialien oder Sensoroberflächen.

25 Dementsprechend können die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine ebenfalls zur Abtrennung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin oder eines mit einer dieser Verbindungen konjugierten Moleküls verwendet werden. In diesem Fall kommen neben den genannten Festphasen auch Säulenmaterialen zur Beschichtung mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen in Betracht. Vorzugsweise kann diese Beschichtung 30 durch Kopplung mittels chemisch reaktiver Gruppen auf geeigneten Säulenmaterialien erfolgen. Derartig beschichtete Säulenmaterialien können zur Abtrennung von mit Digoxigeningruppen konjugierten Substanzen sowie ggf. von Komplexen aus solchen.

Substanzen mit anderen Molekülen aus einer Lösung verwendet werden.

Beispielsweise können so Antigene aus einer Lösung abgetrennt
5 werden, indem die Lösung mit Antikörpern versetzt wird, welche gegen die Antigene gerichtet und mit der Digoxigeningruppe konjugiert sind, und die erhaltene Lösung mit dem genannten Säulenmaterial unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, unter denen eine Komplexbildung zwischen den Digoxigeningruppen
10 und einem erfindungsgemäßen Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder seinem Fusionsprotein erfolgt: Ggf. ist im Anschluß an eine solche Abtrennung auch eine Elution der mit Digoxigenin konjugierten Substanz möglich. Diese Elution kann durch Kompetition mit Digoxin, Digoxigenin, Digitoxin oder Digitoxigenin
15 erfolgen sowie z. B. durch Absenkung oder Erhöhung des pH-Werts der Lösung. Bei einer kompetitiven Elution kann dabei die höhere Bindungsaaffinität der erfindungsgemäßen Muteine zu Digitoxigenin oder Digitoxin im Vergleich zur Digoxigeningruppe in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden. Auf diese Weise läßt sich eine mit Digoxigenin konjugierte Substanz isolieren oder reinigen.
20

Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die nachstehenden Beispiele und die beigefügten Zeichnungen, in denen:

Figur 1 jeweils eine Fluoreszenztitration des mit dem Strep-tag II fusionierten Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain wiedergibt;

30 Figur 2 die Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B) zur Herstellung von Fusionsproteinen des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase schematisch darstellt;

Figur 3 den quantitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen
35 konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase in einem ELISA demonstriert;

Figur 4 den qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase auf einem Western-Blot zeigt.

5

Figur 1 zeigt die graphische Darstellung von Ergebnissen aus Beispiel 3, bei der eine 1 μ M Lösung des Muteins DigA16 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Steroide Digoxigenin (Quadrate), Digitoxigenin (Kreise) und Ouabain (Rauten) ver-
10 setzt wurde. Die jeweiligen Proteinfluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm gemessen und gegen die aktuel-
| le Gesamtkonzentration des Steroids im jeweiligen Ansatz auf-
15 getragen. Die Datenpunkte wurden schließlich mittels nicht linearer Regression durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

Figur 2 zeigt eine Zeichnung der Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B). pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit ihrer eigenen 20 Signalsequenz, einem Peptid-Linker mit der Sequenz Pro-Pro-Ser-Ala, dem Mutein DigA16 sowie dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Das entsprechende Strukturgen wird von dem *dsbC*-Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., Biochemistry 34 (1995), 5075-5089) als zweitem Cistron gefolgt. Das dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tetP/o*) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*tlpp*). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische 30 Region des filamentösen Bakteriophagen f1 (f1-IG), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, dem Mutein DigA16, dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel, einem Peptid-Verbindungs-
35 stück bestehend aus fünf Glycinresten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase ohne ihre N-terminale Aminosäure Arginin. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereiches sind mit dem Vektor pBBP27 identisch.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 4, in dem der quantitative Nachweis von Digoxigeningruppen mit Hilfe der Fusionsproteine des Muteins DigA16 als Genprodukt der Vektoren pBBP27 (geschlossene Symbole) und pBBP29 (offene Symbole) geführt wurde. Hierbei waren die Digoxigeningruppen einerseits an Rinder-Serumalbumin (BSA, Quadrate) oder andererseits an Albumin aus Hühner-Ei (Ovalbumin, Dreiecke) gekoppelt. Als Kontrolle sind die Daten dargestellt, die bei der Verwendung von underivatisiertem Rinder-Serumalbumin sowie dem Fusionsprotein kodiert von pBBP27 erhalten wurden (offene Kreise). Die dem jeweiligen gebundenen Fusionsprotein entsprechende enzymatische Aktivität wurde anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) mittels der Gleichung

$$[P \cdot L] = [L]_t [P]_t / (K_d + [P]_t)$$

Hierbei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten Gesamtkonzentration des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \cdot L]$ wird anhand der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die innerhalb einer Konzentrationsreihe konstante Gesamtkonzentration der Digoxigeningruppen $[L]_t$ je Vertiefung sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden durch nicht lineare Regression als Parameter angepaßt.

Figur 4 zeigt das Ergebnis eines Western Blot-Experiments aus Beispiel 4 zum qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen mittels der von pBBP27 (Spuren 1 und 2) sowie von pBBP29 (Spuren 3 und 4) kodierten Fusionsproteine des Muteins DigA16. Zum Vergleich ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Biomoleküle ebenfalls dargestellt (Spuren 5 und 6). Hierbei wurde in den Spuren 1, 3 und 5 jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg underivatisiertem BSA, underivatisiertem Ovalbumin und underivatisierter RNaseA aufgetrennt. In den Spuren 2, 4 und 6 wurde jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg mit Digoxigeningruppen gekoppelt.

06.06.99

23

- 19 -

tem BSA, mit Digoxigeningruppen gekoppeltem Ovalbumin und mit
Digoxigeningruppen gekoppelter RNaseA aufgetrennt.

06.06.99

24

- 20 -

Beispiele

Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z. B. in Sambrook et
5 al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.

Beispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins, Phagemidpräsentation und Selektion
10 eines Muteins mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurden dessen Aminosäure-Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und
15 127 einer konzertierten Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) in mehreren Schritten unterworfen. Die PCR-Reaktionen wurden zunächst in zwei getrennten Amplifizierungsschritten in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt, wo-
bei 10 ng pBBP20-Phasmid-DNA (SEQ ID NO:1) als Matrize sowie
20 jeweils 25 pmol zweier Primer (SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 in einem Ansatz und SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 in einem zweiten Ansatz), welche nach der allgemein bekannten Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt wurden.

25 Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl über-
schichtet und in einem programmierbaren Thermostatisierblock
30 für 2 min auf 94 °C erhitzt. Anschließend wurden 2,5 u Taq DNA-Polymerase (5 u/µl, Promega) zugegeben und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 1,5 min bei 72 °C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei 60 °C, durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte wurden durch
35 préparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco BRL) isoliert.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines 5 *Xba*I-Überhangs mit einem dazu komplementären *Spe*I-Überhang erhalten wurde, und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

10

Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100 μ l-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng der beiden isolierten Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des Oligodesoxy-15 nukleotids SEQ ID NO:8 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C statt, gefolgt von einer ab-20 schließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C. Das erhaltene Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der 25 Muteine in Form einer Mischung von Nukleinsäuren repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments (335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer Agarose-Gel-30 elektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden 0,93 μ g (4,2 pmol) des PCR-Fragments und 35 11 μ g (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 μ l (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA) für zwei Tage bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 μ l

des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol ver-
setzt wurden. Nach Inkubation bei -20 °C für drei Tage wurde
5 zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4 °C). Das Präzipitat wurde
mit jeweils 200 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und
unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 µl
10 TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die
DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analyti-
sche Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensi-
tät der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Vergleich mit
einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abge-
schätzt.

Die Präparation elektrokompetenter Zellen des *E. coli* K12-
15 Stamms XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-
379) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11
(1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21
(1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde
durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtkultur auf
20 eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und
bei 200 Upm und 26 °C in einem 3 l-Erlenmeyer-Kolben inkuba-
biert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30
min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und
4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils
25 500 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich
in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v
Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio)
30 mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) ver-
wendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlräum bei 4 °C
durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 µl der oben beschriebenen DNA-
Lösung (245 ng/µl) wurde mit 40 µl der Zellsuspension ge-
mischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvet-
te überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension
35 sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Tryp-
ton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM
MgCl₂) verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüt-
telt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei

3600 g sedimentiert, in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 µl auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 µg der ligierten DNA wurden auf 5 diese Weise mit acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanden erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren.

Nach Inkubation für 14 h bei 32 °C wurden die so erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den 10 Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt. 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,88 ml dieser Suspension inkultiert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 1,0 lag. Diese Kultur 15 wurde für 6 h bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer stationären Zelldichte inkubiert und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 100 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4 °C ge-20 lagert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von rekombinanten Phagemiden (Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press), welche die Muteine des 25 Bilin-Bindungsproteins als Fusion mit dem verkürzten Hüllprotein pIII tragen, wurde die so gewonnene Phasmid-DNA zur Transformation elektrokompetenter Zellen von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Elektroporation wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des Easyjec T Basic Systems durchgeführt. In insgesamt 30 13 Ansätzen wurden je 40 µl der Zellsuspension elektrokompetenter Zellen mit jeweils 2 µg der DNA in einem Volumen von 5 µl transformiert. Nach der Elektroporation wurde die erhaltene Zellsuspension aus jedem Ansatz sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 35 Upm geschüttelt.

Diese Ansätze wurden vereinigt (Volumen = 26 ml), mit 74 ml 2xYT-Medium und mit 100 µl Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt. Durch Ausplattieren von

06.06.99

28

- 24 -

100 µl einer 1:10⁵-Verdünnung der erhaltenen Suspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanden zu 1,1·10¹⁰ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C und 160 Upm wurde die Kultur mit 500 µl 5 VCS-M13 Helferphage (1,1·10¹² pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 60 min bei 37 °C, 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26 °C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression 10 Anhydrotetracyclin (50 µl einer 50 µg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 µg/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26 °C, 160 Upm inkubiert.

15 Zwecks Abtrennung der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 12000 g, 4 °C). Der Überstand, der die Phagemidpartikel enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 µm), mit 1/4 Volumen (25 ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 20 g, 4 °C) wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 4 ml kaltem PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zu gleichen Volumina auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 25 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen (jeweils 0,25 ml pro Reaktionsgefäß) 20 % w/v PEG 8000, 15 30 % w/v NaCl gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt; und die präzipitierten Phagemidpartikel wurden in jeweils 0,5 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung zur Klärung noch einmal zentrifugiert (5 min, 35 18500 g, 4 °C). Der Überstand mit den Phagemidpartikeln (zwischen 1·10¹² und 5·10¹² cfu/ml) wurde anschließend für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung der die Muteine des Bilin-Bindungsproteins präsentierenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800 µl eines Konjugats (100 µg/ml) aus Ribonuclease A (RNaseA) und 5 Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugats wurden 1,46 µmol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS, Boehringer Mannheim) in 25 µl DMSO 10 µlweise und unter stetiger Durchmischung zu 0,73 µmol (10 mg) RNaseA (Fluka) in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz von dem RNaseA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule 15 (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 µl der Phagemidlösung und 500 µl Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde die Lösung abgezogen und der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 µl PBST für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 µl einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg 30 Digoxigenin (Fluka) wurden hierzu in 19,2 µl DMF gelöst und zu 930,8 µl PBS gegeben) kompetitiv eluiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurden die 950 µl Lösung der erhaltenen Elutionsfraktion (je nach Selektionszyklus zwischen 35 10⁶ und 10⁸ Colony-forming Units) kurz auf 37 °C erwärmt, mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4 °C), in 800 µl fri-

schen 2xYT-Mediums resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32 °C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inkkuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkuliert, mit 250 µl VCS-M13 Helperphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert, und es wurde weiter verfahren wie bereits oben beschrieben.

Mit den aus der ersten Affinitätsanreicherung erhaltenen Phagemiden wurden nacheinander acht weitere Anreicherungszyklen mit Immuno-Sticks, welche frisch mit dem Digoxigenin-RNaseA-Konjugat beschichtet waren, durchgeführt. Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Mischung der erhaltenen Kolonien wurde, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Um die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem Strep-tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne produzieren zu können, wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in den Vektor pBBP22 subkloniert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:9 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

Dazu wurde die aus der Mischung der *E. coli*-Kolonien isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch préparative Agarose-
5 Gelelektrophorese wie oben beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente
10 in einem Gesamtvolumen von 20 µl (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit 5 µl dieses Ligierungsansatzes wurden 200 µl kompetente Zellen
15 des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert (Sambrook et al., supra), wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.

Die Transformanden wurden anschließend mittels eines Colony Screening Assays auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigeningruppe durchgemustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 µm) aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz
20 gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreichten.
25

30 In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 µm) nach den Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS
35 schwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt

worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

5 Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Muteine
10 10 als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

15 Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml einer Lösung von 10 µg/ml eines Konjugates von BSA mit Digoxigenin in PBST inkubiert.

20 Zur Herstellung des Konjugates von BSA (Sigma) und Digoxigenin wurde eine Lösung von 3,0 µmol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

30 Um gebundenes Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach zweimaligem Waschen in 20 ml PBST für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml
35 PBST und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM Mg₂Cl) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, Roth, 50 µg/ml in Dimethylform-

amid) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, 75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität 5 der von diesen Kolonien produzierten Muteine des Bilin-Bindungsproteins, in Form der Fusionsproteine mit dem Strep-tag und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Vier der Kolonien von der oberen Membran, welche zu einem aus-
10 geprägten Farbsignal Anlaß gaben, wurden zur Herstellung von Kulturen in LB/Amp-Medium mit einem Volumen von 4 ml verwen-
det. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert, und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde
15 einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Hersteller-angaben unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11. Dabei wurde gefunden, daß alle vier untersuchten Plasmide die gleiche Nukleotidsequenz trugen. Das
20 entsprechende Genprodukt wurde als DigA bezeichnet (SEQ ID NO:12). Die Nukleotidsequenz von DigA wurde in die Aminosäure-sequenz übersetzt und ist im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

25 Beispiel 2: Partielle Zufallsmutagenese des Muteins DigA und Selektion von Muteinen mit verbesserter Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Verbesserung der Affinität zwischen dem Mutein DigA und
30 Digoxigenin, welche gemäß Beispiel 3 zu 295 ± 36 nM bestimmt wurde, wurden die 6 Aminosäurepositionen 28, 31 und 34-37 in DigA für eine weitergehende partielle Zufallsmutagenese ausgewählt.

35 Zur Mutagenese dieser Positionen wurde die PCR mit einem dege-
nerierten Oligodesoxynukleotid-Primer durchgeführt. Die Amplifi-
fizierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolume von 100 µl,
wobei 2 ng der für DigA (SEQ ID NO:12) kodierenden Plasmid-DNA des Vektors pBBP22 als Matrize eingesetzt wurden. Der Reakti-

onsansatz enthielt 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:13 und SEQ ID NO:7 sowie die restlichen Komponenten gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 65 °C, 1,5 min bei bei 5 72 °C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C. Das erhaltene DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit *Bst*XI nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des resultierenden DNA-Fragmentes von 335 bp Länge erfolgte wiederum durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.

Entsprechend wurde die DNA des Vektors pBBP24 mit *Bst*XI geschnitten und das erhaltene Fragment von 4028 bp isoliert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP24 15 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:14 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75. pBBP24 ist weitestgehend identisch mit 20 pBBP20 wobei das BBP-Gen mittels entsprechend eingeführter Stopp-Kodons inaktiviert ist.

Zur Ligierung wurden 1,3 µg des geschnittenen DNA-Fragmentes aus der PCR und 16,0 µg des Fragmentes von pBBP24 in Gegenwart 25 von 120 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 600 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für 18 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol 30 versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20 °C für zwei Wochen wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 150 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 80 35 µl TE/10 aufgenommen.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit der ligierten DNA durch Elektroporation wurde gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei in 16 Ansät-

zen jeweils 40 µl Zellsuspension elektrokompetenter Zellen mit 5 µl der DNA-Lösung gemischt wurden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt.

5

Die vereinigten Suspensionen wurden mit 168 ml 2xYT-Medium und mit 200 µl Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l). Durch Ausplattieren von 100 µl einer 1:10⁴-Verdünnung der erhaltenen Zellsuspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanden zu 1,48·10⁹ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C und 160 Upm wurden die Transformanden mit 4 ml VCS-M13 Helferphage (6,3·10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 30 min bei 37 °C und 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 400 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26 °C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (100 µl einer 50 µg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 µg/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26 °C und 160 Upm inkubiert. Die Abtrennung der Zellen und die Reinigung der Phagemide durch Fällung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

25

Zur Affinitätsanreicherung aus der Bibliothek der Phagemide, welche das partiell mutierte Mutein DigA präsentierten, wurden mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

30

Zur Herstellung eines Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin und Biotin wurden 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 µl DMSO und 1,5 µmol (0,68 mg) D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim) in 12,5 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Doppelkonjugat abgetrennt.

Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 µl einer 0,5 µM Lösung des Doppelkonjugats (33,5 µg/ml) in PBS mit 260 µl einer Lösung der frisch präparierten Phagemide 5 (zwischen 5·10¹¹ und 5·10¹² cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß Komplexbildung zwischen der Digoxigenin- gruppe und den von den Phagemiden präsentierten Muteinen ein- treten konnte. Anschließend wurde 100 µl einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.

10

Parallel wurden 100 µl der kommerziell erhältlichen Suspension der paramagnetischen Partikel dreimal mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml Eppendorfgefäßes für 1 min in Suspension gehalten, an- 15 schließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Eppendorf- gefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 µl 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die paramagneti- 20 schen Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 µl einer Lösung von 4 µM D-Desthiobiotin (Sigma) in PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhin- dert, dass das Strep-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Muteinen und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex bilden konnte.

30 Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramag- netischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBST un- ter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte 35 durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 µl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 140 µl 0,5 M Tris neutralisiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurde die erhaltene Elutionsfraktion entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 1 mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue
5 (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4 °C), in 800 µl frischem 2xYT-Medium resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation
10 für 14 h bei 32 °C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm
geschüttelt.

15

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inkkuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37
20 °C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert und mit 300 µl VCS-M13 Helferphage (6,3·10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Affinitätsselektion mit den paramagnetischen Partikeln und dem Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat unter den oben angegebenen Bedingungen. Auf diese Weise wurden insgesamt 4 Selektionszyklen durchgeführt.

Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet.
30 Mit der Mischung der erhaltenen Kolonien, die, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert worden waren, wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers
35 isoliert.

Anschließend wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen wie in Beispiel 1 aus dem Vektor pBBP24 in den Vektor pBBP22 subkloniert und kompetente Zellen des Stamms *E.*

coli TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert. Die Transformanden wurden schließlich wiederum gemäß Beispiel 1 auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigeningruppe mittels des Colony Screening Assays durchgemustert.

Sieben der Kolonien, die im Colony Screening Assay eine starke Signalintensität aufwiesen, wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde wie in Beispiel 1 einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß alle untersuchten Plasmide unterschiedliche Sequenzen besaßen. Nach Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wiesen sechs der sieben untersuchten Varianten ein Amber Stopp-Kodon an der Aminosäureposition 28 auf. Dieses Stopp-Kodon wurde allerdings bei der Wahl geeigneter Amber-Suppressorstämmе, wie zum Beispiel *E. coli* XL1-Blue oder TG1-F⁻, zumindest teilweise supprimiert und statt dessen als Glutamin translatiert. Somit wurde sowohl im Verlauf der Affinitätsanreicherung als auch beim Colony Screening Assay funktionelles Protein in voller Länge produziert.

Als einziges unter den gefundenen Muteinen wies das Mutein mit der SEQ ID NO:15 kein Amber-Stoppkodon auf, so daß es sich zur bakteriellen Produktion besonders gut eignete. Dieses Mutein, auch als DigA16 bezeichnet, wurde demzufolge hinsichtlich seiner Bindfähigkeit für die Digoxigeningruppe genauer charakterisiert.

30

Beispiel 3: Produktion der Muteine DigA und DigA16 und Ermittlung ihrer Affinität für Digoxigenin und dessen Derivate durch Fluoreszenztitration

35

Zur präparativen Produktion der aus den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurde der kodierende Genabschnitt zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor des Typs pBBP22 in das Expressions-

plasmid pBBP21 subkloniert. Das dabei erhaltene Plasmid kodierte für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, gefolgt von dem Mutein und dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel.

- 5 Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:16 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem auf-
10 gefüllten *Hind*III-Strangende erhalten wurde, wobei die ursprüngliche *Hind*III-Schnittstelle verloren ging. Die Vektor-
elemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vek-
tor pASK75.
- 15 Zur Subklonierung wurde die für das jeweilige Mutein kodierende Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21
20 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µl (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und für 16 h bei 16 °C inkubiert. Mit 5 µl des Ligierungsansatzes wurde dann *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119) nach der CaCl₂-Methode transformiert, wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.
25 30 Von dieser Suspension wurden 100 µl auf einer Agar-Platte mit LB/Amp-Medium ausplattiert und für 14 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Proteinproduktion wurde eine der erhaltenen Einzelkolonien ausgewählt, eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) damit angeimpft und bei 30 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 40 ml der Vorkultur wurden auf 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22 °C und 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 µg/l Anhydrotetra-

cyclin (200 µl einer 2 mg/ml-Stammlösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22 °C, 200 Upm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4 °C) und nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml Periplasma-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15 min, 4420 g, 4 °C und 15 min, 30000 g, 4 °C). Der so gewonnene periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert, sterilfiltriert und zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

15 Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der Muteine fusionierten Strep-tag II-Affinitätsanhängsels (Schmidt und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 109-122). Im vorliegenden Fall wurde das Streptavidinmutein "1" eingesetzt (Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), welches (mit 5 mg/ml 20 immobilisiertem Streptavidin, bezogen auf das Bettvolumen der Matrix) an eine aktivierte Sepharose gekoppelt war.

Eine mit 2 ml dieses Materials befüllte Chromatographiesäule wurde bei 4 °C und einer Flußrate von 20 ml/h mit 10 ml SA-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem Durchfluß-Photometer verfolgt. Nach dem Auftragen des periplasmatischen Proteinextrakts wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-Puffer gewaschen. Gebundenes Mutein wurde anschließend mit 10 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) in SA-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das gereinigte Mutein enthielten, wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fling und Gregerson, Anal. Biochem. 155 (1986), 83-88) überprüft und vereinigt. Die Proteinausbeuten lagen zwischen 35 200 µg und 800 µg je 2 l Kultur.

Die Liganden-Bindungseigenschaften der Muteine DigA, DigA16 sowie des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins (SEQ ID NO:16) wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt.

Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und/oder Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei
5 einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Als Liganden wurden Digoxigenin (Fluka), Digoxin (Fluka), Digitoxigenin (Fluka), Digitoxin (Fluka), Testosteron (Sigma), Ouabain (Fluka) sowie 4-Aminofluorescein (Fluka) eingesetzt.
10 Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine signifikante Eigenfluoreszenz oder Absorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA. Die Lösung des jeweiligen gereinigten Muteins wurde viermal gegen
15 diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine Konzentration von 1 μ M eingestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 μ m, Sarstedt). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktionskoeffizienten von
20 53580 $M^{-1} cm^{-1}$ für Diga und DigA16 (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group). Für Bbp wurde der nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326) in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierte kalkulatorische Extinktionskoeffizient von 54150 $M^{-1} cm^{-1}$ verwendet.

25 Zur Messung wurden 2 ml der Muteinlösung in einer Quarzküvette, die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25 °C temperiert. Anschließend wurden insgesamt 40 μ l einer 100 μ M bis 500 μ M Lösung des Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μ l bis 4 μ l zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

06.06.99

42

- 38 -

Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt.

$$5 \quad F = ([P]_t - [L]_t - K_d) \frac{f_p}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_p - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt. $[P]_t$ als die Konzentration des Muteins, f_{PL} als 10 Fluoreszenzkoeffizient des Mutein-Ligandkomplexes und K_d als die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses Komplexes wurden als freie Parameter an die normierten Daten angepaßt.

Das Ergebnis der Fluoreszenztitrationen des Muteins DigA16 mit 15 den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain ist in Figur 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß Digitoxigenin noch stärker gebunden wird als Digoxigenin, während für Ouabain keine Bindung beobachtet wird.

20 Die aus den Fluoreszenztitrationen resultierenden Werte für die Dissoziationskonstanten der Komplexe aus den Muteinen des Bilin-Bindungsproteins und den verschiedenen Liganden sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	<u>Bbp-Variante</u>	<u>Ligand</u>	<u>K_d [nM]</u>
	Bbp:	Digoxigenin	-*
DigA:	Digoxigenin	295 ± 37	
	Digoxin	200 ± 34	
30 DigA16:	Digoxigenin	$30,2 \pm 3,6$	
	Digoxin	$31,1 \pm 3,2$	
	Digitoxigenin	$2,8 \pm 2,7$	
	Digitoxin	$2,7 \pm 2,0$	
	Ouabain	-*	
	Testosteron	-*	
35	4-Aminofluorescein	-*	

*keine nachweisbare Bindungsaktivität

Beispiel 4: Herstellung von Fusionsproteinen aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase und Verwendung zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem ELISA sowie im Western Blot

5

Um zwei verschiedene Fusionsproteine aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit unterschiedlicher Anordnung der Partner innerhalb der Polypeptidkette zu produzieren, wurden unter Einsatz der dem Fachmann 10 geläufigen molekularbiologischen Methoden die beiden Expressionsplasmide pBBP27 und pBBP29 konstruiert.

| pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus PhoA einschließlich deren Signalsequenz, einem kurzen Peptid-Verbindungsstück mit 15 der Aminosäuresequenz Pro-Pro-Ser-Ala, der dem maturen Mutein DigA16 entsprechenden Sequenz sowie dem Strep-tag II. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP27 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:17 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der 20 XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

25 pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus DigA16 mit vorangestellter OmpA-Signalsequenz, gefolgt von der Peptidsequenz für das Strep-tag II, einer Sequenz von 5 Glycinresten und der maturen Sequenz der PhoA ohne die N-terminale Aminosäure Arginin. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP29 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:18 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

35 Beide Plasmide kodieren zusätzlich für die bakterielle Protein-Disulfidisomerase DsbC auf einem separaten, in 3'-Richtung gelegenen Cistron. Die Plasmide sind in Figur 2 schematisch dargestellt.

Die von den Plasmiden pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine wurden analog der in Beispiel 3 beschriebenen Methode zur Herstellung der einfachen Muteine produziert. Um nicht die Metallionen aus dem aktiven Zentrum der PhoA zu komplexieren, 5 wurde der Aufschluß des bakteriellen Periplasmas mit EDTA-freiem Aufschlußpuffer durchgeführt. Als ein die äußere Zellmembran destabilisierendes Agens wurde dem Puffer Polymyxin-B-sulfat (2 mg/ml, Sigma) zugegeben. Alle weiteren zur Reinigung eingesetzten Puffer waren ebenfalls EDTA-frei.

10 Die mittels des Strep-tag II durch Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteine wurden über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Ausbeuten der Fusionsproteine lagen zwischen 100 und 200 µg je 2 l Kulturmedium. Die Reinheit der erhaltenen Fusionsproteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelektrophorese, entsprechend Beispiel 3, überprüft und zu 90-95 % bestimmt. Anschließend wurden die Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Konjugaten der Digoxigeningruppe mit verschiedenen Proteinen sowohl in einem Sandwich-ELISA als auch im 15 20 Western-Blot verwendet.

Während die verwendeten Konjugate von Digoxigenin mit RNaseA und BSA entsprechend Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin (Sigma) hergestellt, 25 indem 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat gegeben wurden. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach 30 den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt.

Zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem Sandwich-ELISA wurden die Vertiefungen von jeweils zwei Spalten einer Mikro- 35 titerplatte (ELISA-Strips, 2x8 Well mit hoher Bindekapazität, F-Form, Greiner) mit je 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Digoxigenin-Konjugates bzw. des Ovalbumin-Digoxigenin-Konjugates in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden die Vertiefungen einer fünften Spalte der Mikro-

titerplatte mit 100 µl einer 100 µg/ml Lösung von nicht konjugiertem BSA (Sigma) in PBS gefüllt und ebenfalls über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 µl einer Lösung von 2 % w/v BSA in 5 PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 50 µl einer 1 µM Lösung des gereinigten Fusionsproteins gefüllt und die Tween-Konzentration durch Zugabe von 1 µl einer Lösung von 5 % v/v Tween auf 0,1 % v/v eingestellt. In den darauffolgenden 10 Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 µl PBST vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 µl des gereinigten Fusionsproteins pipettiert, gemischt und davon ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Spalte schrittweise 1:2 Verdünnungen zubereitet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden 15 die Vertiefungen zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Digoxigeningruppen gebundenen Fusionsproteine erfolgte schließlich mittels der durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 µl einer Lösung von 0,5 mg/ml p- 20 Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.

25 Das Ergebnis dieser Messung ist in Figur 3 wiedergegeben. Dementsprechend wird die Digoxigeningruppe sowohl als Konjugat mit BSA wie auch als Konjugat mit Ovalbumin erkannt, was darauf schließen läßt, daß die Bindung durch das Mutein DigA16 kontextunabhängig erfolgt. Weiterhin sind beide Fusionsproteine 30 sowohl hinsichtlich der Bindungsfunktion für die Digoxigeningruppe als auch enzymatisch aktiv, und sie geben trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus Anlaß zu nahezu identischen Signalen.

35 Zur Verwendung der von den Vektoren pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine im Western-Blot wurden 5 µl einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an Digoxigenin-BSA-Konjugat, Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat und Digoxigenin-RNaseA-Konjugat gleichzeitig jeweils 100 µg/ml betrug, sowie 5 µl

einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an nicht-de-
rivatisiertem BSA, Ovalbumin und RNaseA ebenfalls gleichzeitig
jeweils 100 µg/ml betrug, zunächst durch SDS-Polyacrylamid-
Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Protein-
5 gemisch durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose übertragen
(Blake et al., Anal. Biochem. 136 (1984), 175-179). Die Mem-
bran wurde anschließend dreimal für 5 min in 10 ml PBST gewa-
schen und für 1 h mit 10 ml einer 0,5 µM Lösung jeweils eines
10 der beiden Fusionsproteine inkubiert. Danach wurde die Membran
zweimal für 5 min in 10 ml PBST und zweimal für 5 min in 10 ml
PBS gewaschen und schließlich für 10 min in 10 ml AP-Puffer
geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran
15 in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl BCIP (50 µg/ml in Dimethylform-
amid) und 5 µl NBT (75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zu-
gesetzt waren, inkubiert und auf diese Weise gebundenes Fusi-
onsprotein nachgewiesen.

Das Ergebnis dieses Nachweisverfahrens ist in Figur 4 wieder-
gegeben. Es zeigt sich wiederum, daß die Bindung der Digoxige-
20 ningruppe durch beide Fusionsproteine unabhängig vom Träger-
protein ist, und daß mit beiden Fusionsproteinen vergleichbare
Signalintensitäten erzielt werden. Dieselben Trägerproteine
führen zu keinerlei Signal, wenn sie nicht mit der Digoxige-
ningruppe konjugiert sind.

Patentansprüche

1. Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins,
dadurch gekennzeichnet, daß es
 - (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
 - (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
 - (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.
- 15 2. Polypeptid nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Dissoziationskonstante des Komplexes mit Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist..
- 20 3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein trägt.
- 30 4. Polypeptid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Enzymmarkierung, radioaktiver Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumineszenzmarkierung
35 oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold, trägt.
5. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,
daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

6. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.
- 15 7. Nukleinsäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodierende Sequenz umfaßt.
- 20 8. Verfahren zur Herstellung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird.
- 30 9. Verwendung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 zur Bindung, zum Nachweis, zur Bestimmung, Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

LÖ-06-99

69

- 45 -

10. Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

09.06.99

50
73

- 47 -

Sequenzprotokoll

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Prof. Dr. Arne Skerra
STRASSE: Max-Lehner-Straße 18
ORT: Freising
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 85354
TELEFON: 08161-714351
TELEFAX: 08161-714352

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Muteine des Bilin-Bindungsproteins

ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM PC-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
SOFTWARE: Microsoft Word, Format Text

DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: noch nicht bekannt
ANMELDETAG: noch nicht bekannt

ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1219 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Doppelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Phasmids pBBP20

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..1209)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
Strep-tag II und Fragment des Phagen-
Hüllproteins pIII"

/Codon=(Sequenz: "TAG", Aminosäure: Gln)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"

0...06.90

- 48 -

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (607..636)
SONSTIGE ANGABEN:
-/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (637..639)
SONSTIGE ANGABEN:
/Sonstiges="Amber-Stopcodon"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (640..1209)
SONSTIGE ANGABEN:
/Produkt="Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII"

| SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

TCTAGTTAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
-21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
20 25 30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
50 55 60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
95 100 105

06.06.99

- 49 -

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
Thr Gly Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
170 175 180

GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC 675
Glu Lys Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
185 190 195

TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC 720
Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
200 205 210

TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765
Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe
215 220 225

GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810
Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu
230 235 240

AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855
Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu
245 250 255

GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900
Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
260 265 270

GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945
Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
275 280 285

TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990
Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp
290 295 300

AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035
Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu
305 310 315

0...06.99

- 50 -

CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080
Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys
320 325 330

CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125
Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg
335 340 345

GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
350 355 360

TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209
Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
365 370 375

TAATAAGCTT 1219

ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 64 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

CCATGGTAAA TGGTGGGAAG TCGCCAAATA CCCCNKNMS NNSNNKAAGT 50
ACGGAAAGTG CGGA 64

ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 71 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

GGGTAGGCCG TACTTCSNN AAAGTATTCC TTGCCGTGGA TTACMNNGTA 50
SNNCGAAACT TTGACACTCT T 71

ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 74 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

06.06.99

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNNSA CTNNKGGAGG TNNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74

ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 78 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCNNNTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
NNNGCAMNN GTATCCGATG ATGTAGTT 78

ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 36 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

CTTCGACTGG TCCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36

ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 37 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

CACCAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 46 Basen
ART: Nucleinsäure
STRÄNGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

08.06.99

- 52 -

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

AGATCTTCC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46

ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 793 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP22

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: Signalpeptid

lage: (22..84)

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: reifes Peptid

lage: (85..783)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
Strep-tag II und Albumin-Bindungsdomäne"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (637..783)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

TCTAGATAAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
-21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
20 25 30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
50 55 60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
170 175 180

GAA AAA CCA GCT AGC CTG GCT GAA GCT AAA GTT CTG GCT AAC CGT 675
Glu Lys Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
185 190 195

GAA CTG GAC AAA TAC GGT GTT TCC GAC TAC TAC AAA AAC CTC ATC 720
Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
200 205 210

AAC AAC GCT AAA ACC GTT GAA GGT GTT AAA GCT CTG ATC GAC GAA 765
Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu
215 220 225

06.-06.-99

- 54 -

ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT
Ile Leu Ala Ala Leu Pro
230

793.

ANGABEN ZU SEQ ID 10:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

LÄNGE: 17 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

GACGGTGCGT GTCCCGA 17

ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 17 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GACTACTGGG GAGCCGA 17

ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

SEQUENZCHARACTERISTIKA:

LÄNGE: 522

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: codierende Sequenz des Muteins DigA

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1..522)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Mutein DigA ohne Fusionsanteile"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC 45
Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp
1 5 10 15

AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC 90
Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala
20 25 30

00-06-99

- 55 -

AAA TAC CCC CAT CAC GAG CGG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135
Lys Tyr Pro His His Glu Arg Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala
35 40 45

GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180
Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser
50 55 60

GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225
Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro
65 70 75

GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
80 85 90

GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
95 100 105

AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
110 115 120

AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met
125 130 135

GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile
140 145 150

GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
155 160 165

TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT
Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
170 522

ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 76 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

CTGGTCCCAG TACCATGGTA AATGGTGGNN KGTCGCCNNK TACCCCNKN 50
NKNKNNKAA GTACGGAAAG TGCGGA 76

0..06.99

- 56 -

ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1219 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Doppelstrang
TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Phasmids pBBP24

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..1209)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
Strep-tag II und Fragment des Phagen-
Hüllproteins pIII, mit unterbrochenem
Leserahmen"

/Codon=(Sequenz:"TAG", Aminosäure:Gln)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein mit
unterbrochenem Leserahmen"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhänger"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (637..639)

SONSTIGE ANGABEN:

/Sonstiges="Amber-Stopcodon"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (640..1209)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
-21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

06.06.99

- 57 -

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
20 25 30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAT TAA TGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Asn Trp Ala Glu Tyr
35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
50 55 60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
Tyr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
170 175 180

GAA AAA TAG GCT GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC 675
Glu Lys Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
185 190 195

TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC 720
Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
200 205 210

0...06.99

- 58 -

TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765
 Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe
 215 220 225

GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810
 Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu
 230 235 240

AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855
 Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu
 245 250 255

GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900
 Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
 260 265 270

GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945
 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 275 280 285

TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp
 290 295 300

AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035
 Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu
 305 310 315

CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080
 Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys
 320 325 330

CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125
 Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg
 335 340 345

GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
 Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
 350 355 360

TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209
 Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 365 370 375

TAATAAGCTT 1219

ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

SEQUENZCHARACTERISTIKA:

LÄNGE: 522

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: codierende Sequenz des Muteins DigA16

06.06.99

- 59 -

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1..522)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Mutein DigA16 ohne Fusionsanteile"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC 45
Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp
1 5 10 15

AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG GTC GCC 90
Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln Val Ala
20 25 30

GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135
Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala
35 40 45

GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180
Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser
50 55 60

GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225
Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro
65 70 75

GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
80 85 90

GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
95 100 105

AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
110 115 120

AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met
125 130 135

GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile
140 145 150

GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
155 160 165

TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT 522
Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
170

06.06.90

- 60 -

ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1380 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Doppelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP21

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und Strep-tag II"

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (658..717)

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (718..1365)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="DsbC-Protein"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
-21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
20 25 30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
50 55 60

00:06:00

- 61 -

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
 80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

GAA AAA TAATAAGCTT CGGGAAGATT T ATG AAG AAA GGT TTT ATG 675
 Glu Lys Met Lys Lys Gly Phe Met
 -20 -15

TTG TTT ACT TTG TTA GCG GCG TTT TCA GGC TTT GCT CAG GCT GAT 720
 Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly Phe Ala Gln Ala Asp
 -10 -5 -1 1

GAC GCG GCA ATT CAA CAA ACG TTA GCC AAA ATG GGC ATC AAA AGC 765
 Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met Gly Ile Lys Ser
 5 10 15

AGC GAT ATT CAG CCC GCG CCT GTA GCT GGC ATG AAG ACA GTT CTG 810
 Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys Thr Val Leu
 20 25 30

ACT AAC AGC GGC GTG TTG TAC ATC ACC GAT GAT GGT AAA CAT ATC 855
 Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys His Ile
 35 40 45

ATT CAG GGG CCA ATG TAT GAC GTT AGT GGC ACG GCT CCG GTC AAT 900
 Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val Asn
 50 55 60

09.06.99

- 62 -

GTC ACC AAT AAG ATG CTG TTA AAG CAG TTG AAT GCG CTT GAA AAA 945
 Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 65 70 75

GAG ATG ATC GTT TAT AAA GCG CCG CAG GAA AAA CAC GTC ATC ACC 990
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr
 80 85 90

GTG TTT ACT GAT ATT ACC TGT GGT TAC TGC CAC AAA CTG CAT GAG 1035
 Val Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu
 95 100 105

CAA ATG GCA GAC TAC AAC GCG CTG GGG ATC ACC GTG CGT TAT CTT 1080
 Gln Met Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu
 110 115 120

GCT TTC CCG CGC CAG GGG CTG GAC AGC GAT GCA GAG AAA GAA ATG 1125
 Ala Phe Pro Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met
 125 130 135

AAA GCT ATC TGG TGT GCG AAA GAT AAA AAC AAA GCG TTT GAT GAT 1170
 Lys Ala Ile Trp Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp
 140 145 150

GTG ATG GCA GGT AAA AGC GTC GCA CCA GCC AGT TGC GAC GTG GAT 1215
 Val Met Ala Gly Lys Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp
 155 160 165

ATT GCC GAC CAT TAC GCA CTT GGC GTC CAG CTT GGC GTT AGC GGT 1260
 Ile Ala Asp His Tyr Ala Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly
 170 175 180

ACT CCG GCA GTT GTG CTG AGC AAT GGC ACA CTT GTT CCG GGT TAC 1305
 Thr Pro Ala Val Val Leu Ser Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr
 185 190 195

CAG CCG CCG AAA GAG ATG AAA GAA TTC CTC GAC GAA CAC CAA AAA 1350
 Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu Phe Leu Asp Glu His Gln Lys
 200 205 210

ATG ACC AGC GGT AAA TAATTCCCGT AGCTT 1380
 Met Thr Ser Gly Lys
 215

ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2009 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP27

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (23..85)

00.06.99

- 63 -

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (86..1999)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase,
Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala, Mutein DigA16
und Strep-tag II"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (86..1435)

SONSTIGE ANGABEN:

/PRODUKT="maturer Teil der Alkalischen Phosphatase"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1436..1447)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1448..1969)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Mutein DigA16"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1970..1999)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

TCTAGAACAT GGAGAAAATA AA GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG 46
Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu
-21 -20 -15

CA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA 91
Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr
-10 -5 -1 1

CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT 136
Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile
5 10 15

ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC 181
Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala
20 25 30

GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT 226
Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile
35 40 45

TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA 271
Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala
50 55 60

CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT 316
Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp
65 70 75

GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA 361
Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys
80 85 90

AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA 406
Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala
95 100 105

ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC 451
Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly
110 115 120

GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA 496
Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala
125 130 135

AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG 541
Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu
140 145 150

CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC 586
Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg
155 160 165

AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC 631
Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn
170 175 180

GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT 676
Ala Leu Glu Lys Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu
185 190 195

AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG CTT GGC GGC GCA AAA ACC TTT 721
Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Ala Lys Thr Phe
200 205 210

GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT 766
Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg
215 220 225

GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC 811
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala
230 235 240

TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT 856
Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu
245 250 255

GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG 901
Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro
260 265 270

AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT 946
Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys
275 280 285

ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG 991
Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln
290 295 300

ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC 1036
Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly
305 310 315

TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT 1081
Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His
320 325 330

GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT 1126
Ile Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp
335 340 345

GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC 1171
Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn
350 355 360

ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT 1216
Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile
365 370 375

GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT 1261
Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn
380 385 390

ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA 1306
Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu
395 400 405

GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG 1351
Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala
410 415 420

TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC 1396
Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr
425 430 435

GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA CCG CCT 1441
Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Pro Pro
440 445 450

AGC GCT GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA 1486
Ser Ala Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro
455 460 465

GTC GAC AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG 1531
Val Asp Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln
470 475 480

GTC GCC GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA 1576
Val Ala Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly
485 490 495

TGG GCT GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC 1621
Trp Ala Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg
500 505 510

TAC TCT GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC 1666
Tyr Ser Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala
515 520 525

TAC CCA GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC 1711
Tyr Pro Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr
530 535 540

ACT ATT GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC 1756
Thr Ile Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser
545 550 555

ACT GAC AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC 1801
Thr Asp Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp
560 565 570

GAG GAC AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA 1846
Glu Asp Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg
575 580 585

AGC ATG GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC 1891
Ser Met Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr
590 595 600

CTT ATC GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT 1936
Leu Ile Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser
605 610 615

GAC TTC TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT 1981
Asp Phe Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser
620 625 630

CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAATAAGCTT 2009
His Pro Gln Phe Glu Lys
635

ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2005 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP29

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (22..84)

08.06.99

- 67 -

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: reifes Peptid

lage: (85..1998)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Mutein DigA16, Strep-tag II,
Verbindungspeptid Gly(5) und Alkalischer
Phosphatase"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/PRODUKT="Mutein DigA16"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (637..651)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Verbindungspeptid Gly-Gly-Gly-Gly-Gly"

MERKMAL:

NAME/Schlüssel: codierende Sequenz

lage: (652..1998)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Alkalische Phosphatase ohne Signalsequenz und N-terminales Arg"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
-21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
-10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG GTC GCC GCG TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln Val Ala Ala Tyr
20 25 30

CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser Val Ile
50 55 60

08-16-99

- 68 -

CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile Gly Gly
 80 85 90

GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

GAA AAA GGT GGC GGC GGT GGT ACA CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA 675
 Glu Lys Gly Gly Gly Gly Thr Pro Glu Met Pro Val Leu Glu
 185 190 195

AC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC 720
 Ser Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg
 200 205 210

CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC 765
 Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser
 215 220 225

GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG 810
 Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met
 230 235 240

GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG 855
 Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala
 245 250 255

GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA 900
 Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln
 260 265 270

08-06-99

- 69 -

TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC 945
Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr
275 280 285

GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC 990
Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val
290 295 300

AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT 1035
Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp
305 310 315

CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC 1080
His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr
320 325 330

GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG 1125
Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala
335 340 345

CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG 1170
Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala
350 355 360

ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA 1215
Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys
365 370 375

GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG 1260
Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr
380 385 390

CTT GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT 1305
Leu Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly
395 400 405

GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT 1350
Leu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly
410 415 420

TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA 1395
Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu
425 430 435

GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT 1440
Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn
440 445 450

ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT 1485
Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn
455 460 465

ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT 1530
Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn
470 475 480

08-06-99

71

- 70 -

GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA 1575
Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu
485 490 495

TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT 1620
Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly
500 505 510

GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA 1665
Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln
515 520 525

ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG 1710
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu
530 535 540

GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT 1755
Slu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala
545 550 555

GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT 1800
Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala
560 565 570

CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG 1845
Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met
575 580 585

GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC 1890
Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr
590 595 600

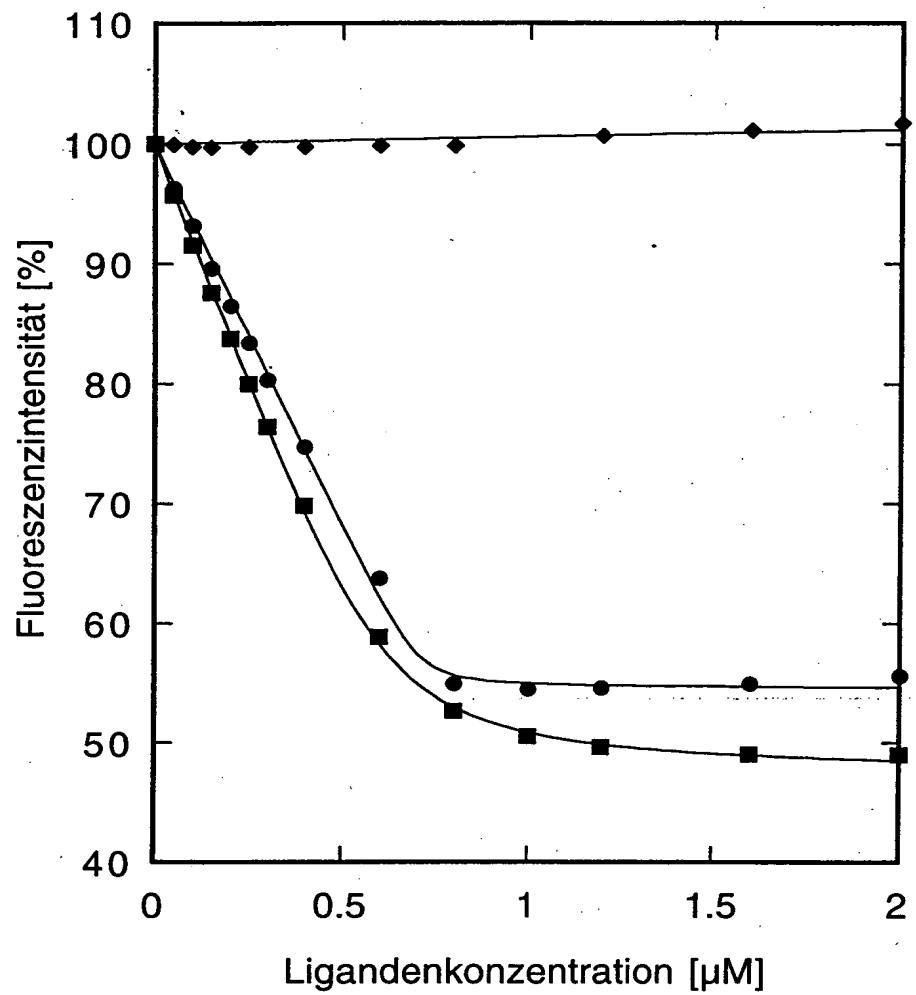
GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT 1935
Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn
605 610 615

GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA 1980
Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys
620 625 630

GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAAGCTT 2005
Ala Ala Leu Gly Leu Lys
635

08.06.99

74

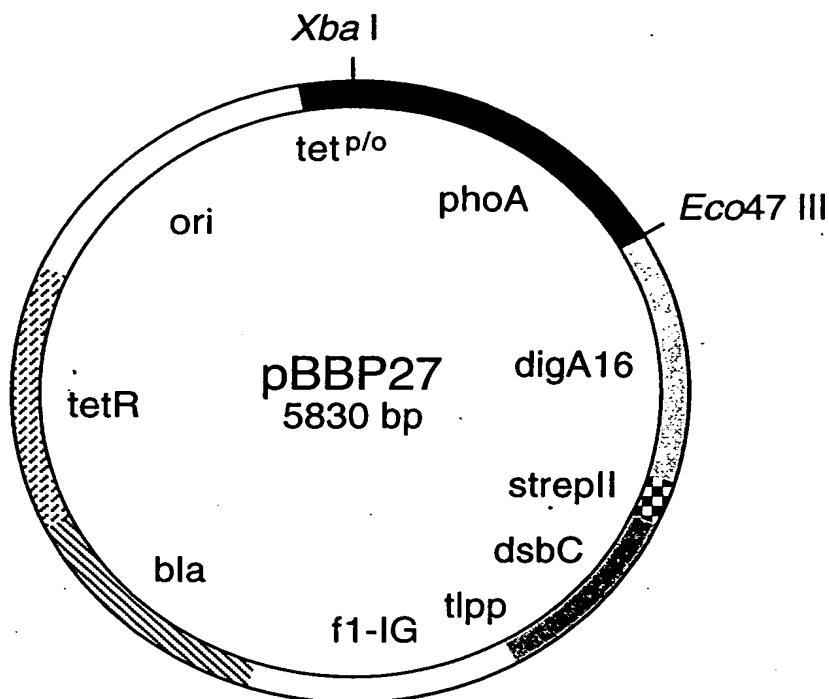


Figur 1

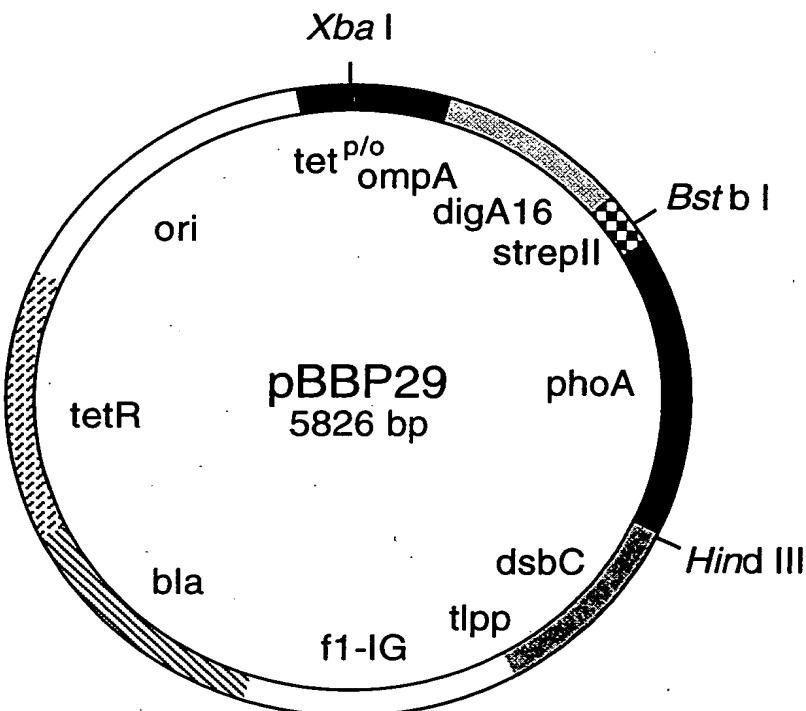
06.06.99

15

A



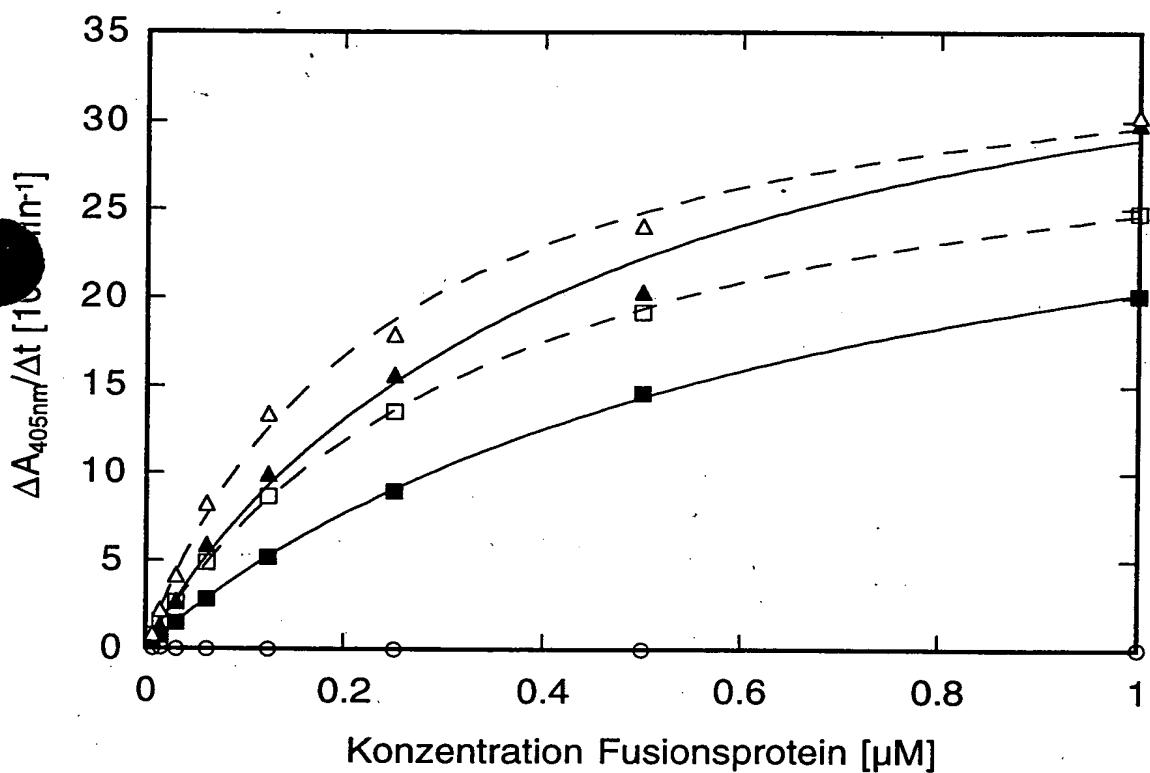
B



Figur 2

08.06.99

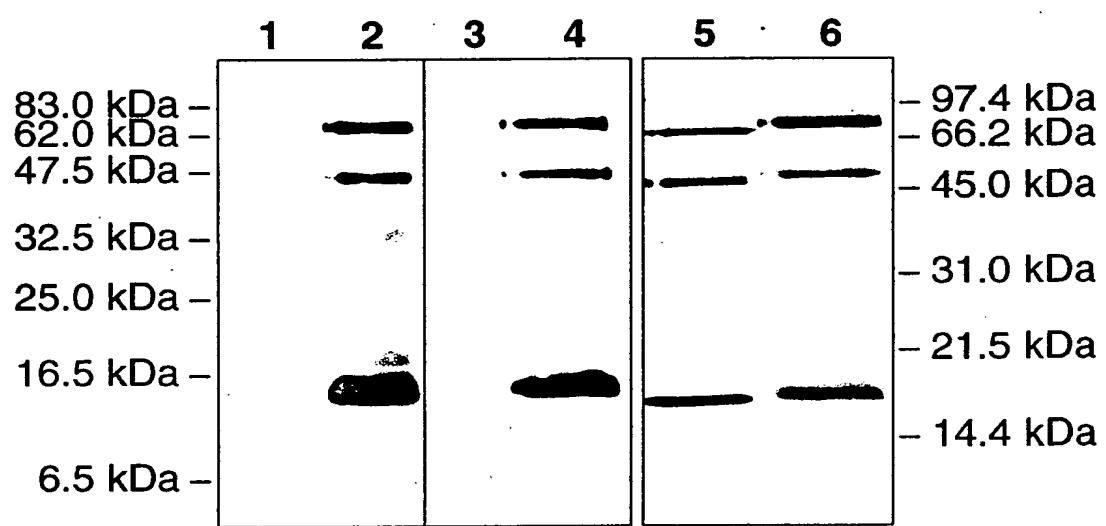
76



Figur 3

06-06-99

77



Figur 4